

**Métodos de Inoculação e
Testes de Patogenicidade de
Fusarium oxysporum f. sp.
cubense para a Seleção de
Plantas Visando à
Resistência ao Mal-do-
panamá**



República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Conselho de Administração

Marcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

José Honório Accarini
Sergio Fausto
Dietrich Gerhad Quest
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Bonifácio Hideyuki Nakasu
Dante Daniel Giacomelli Scolari
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Amapá

Arnaldo Bianchetti
Chefe-Geral

Antônio Carlos Pereira Góes
Chefe-Adjunto de Administração

Gilberto Ken-Iti Yokomizo
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento



Empresa brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agroflorestal do Amapá
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1517-4859
Dezembro, 2002

Documentos 37

Métodos de Inoculação e Testes de Patogenicidade de *Fusarium* *oxysporum* f. sp. *cubense* para a Seleção de Plantas Visando à Resistência ao Mal-do-panamá

Jurema do Socorro Azevedo Dias

Macapá, AP
2002

Exemplares desta edição podem ser adquiridos na:

Embrapa Amapá

Endereço: Rodovia Juscelino Kubitschek, km 05, CEP-68.903-000,

Caixa Postal 10, CEP-68.906-970, Macapá, AP

Fone: (96) 241-1551

Fax: (96) 241-1480

Home page: <http://www.cpaap.embrapa.br>

E-mail: sac@cpafap.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Nagib Jorge Melém Júnior

Secretária: Solange Maria de Oliveira Chaves Moura

Membros: Edyr Marinho Batista, Gilberto Ken-Iti Yokomizo, Raimundo

Pinheiro Lopes Filho, Silas Mochiutti, Valéria Saldanha Bezerra.

Supervisor Editorial: Nagib Jorge Melém Júnior

Revisor de texto: Elisabete da Silva Ramos

Normalização bibliográfica: Maria Goretti Gurgel Praxedes

Foto da capa:

Editoração Eletrônica: Otto Castro Filho

1ª Edição

1ª Impressão 2001: tiragem 150 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Amapá

Dias, Jurema do Socorro Azevedo.

Métodos de Inoculação e Testes de Patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* para a seleção de plantas visando à resistência ao mal-do-Panamá / Jurema do Socorro Azevedo Dias. - Macapá: Embrapa Amapá, 2002.

xvp. ; 21 cm (Embrapa Amapá. Documentos, 37).

ISSN 1517-4859

1. Banana. 2. de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. 3. Testes de Patogenicidade. 4. Resistência. 5. Mal-do-Panamá. I. Título. II. Série.

CDD: 634.772

Autor

Jurema do Socorro Azevedo Dias

Eng. Agr., M. Sc., Rodovia Juscelino Kubitschek, km 05, CEP-68.903-000, Caixa Postal 10, CEP-68.906-970, Macapá, AP (96) 241-1551, sac@cpafap.embrapa.br

Apresentação

A bananicultura é uma das mais importantes atividades da fruticultura no Brasil, e também de toda a região tropical e subtropical, sendo a segunda fruta mais consumida no mundo, deste modo existe grande interesse em realizar pesquisas com esta cultura que possam otimizar seu cultivo, elevando a produtividade, a vida útil dos pomares, diminuindo o uso de defensivos químicos e elevando a qualidade do produto final. O Amapá já se destacou na produção de bananas na região norte do País, mas com o aumento dos níveis de doenças teve sua produção abalada significativamente, porém seu consumo continua a crescer e deste modo a Embrapa Amapá não poderia deixar de direcionar esforços para tentar solucionar os problemas da bananicultura no Estado. Uma das limitações para o desenvolvimento dos trabalhos de melhoramento genético tem sido as técnicas de patogenicidade de doenças empregadas que demandam muito tempo, e hoje a eficiência de qualquer programa está intimamente associada com a rapidez de respostas.

Visando oferecer informações referentes a este assunto o presente documento apresenta a descrição de várias metodologias de inoculação, com aspectos técnicos, limitações gerais, para avaliar a patogenicidade do causador do Mal-do-Panamá em bananeiras, podendo servir como instrumento de decisão na metodologia a ser adotada em programas de melhoramento genético da bananeira no Amapá.

Gilberto Ken-Iti Yokomizo
Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Sumário

Métodos de Inoculação e Testes de Patogenicidade de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> para a Seleção de Plantas Visando à Resistência ao Mal-do-panamá.....	9
Introdução.....	9
Métodos de inoculação e testes de patogenicidade de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> em bananeiras.....	10
Considerações Finais.....	13
Referências Bibliográficas.....	13

Métodos de Inoculação e Testes de Patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* para a seleção de plantas visando à resistência ao mal-do-Panamá

Jurema do Socorro Azevedo Dias

Introdução

Para a propagação de material livre de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), a cultura de meristemas *in vitro*, pode ser usada a partir de explantes obtidos de ápices livres da doença. A cultura de tecidos é, portanto, uma técnica de grande importância na obtenção de mudas sadias. Assim, vários trabalhos já foram desenvolvidos para a propagação clonal da bananeira.

Trabalhos com variação somaclonal, têm sido desenvolvidos visando a obtenção de cultivares resistentes ao mal-do-Panamá, onde de 20.000 plantas testadas em Taiwan, seis se mostraram altamente resistentes às raças 1e 4 do patógeno (Hwang, 1991).

Uma das limitações nos trabalhos de melhoramento tem sido o teste de patogenicidade, pois as plantas provenientes de cultura de tecidos, quando transplantadas para o solo altamente infestado, somente serão avaliadas quanto à resistência à doença, a partir de um longo intervalo de tempo, após o transplântio. Porém, diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos no sentido de tornarem estas técnicas mais práticas e mais rápidas, visando uma avaliação de resistência à doença em menor espaço de tempo.

Um método mais rápido de avaliação quanto à resistência à FOC, vem sendo desenvolvido e utilizado em Taiwan (Hwang, 1991) e na África do Sul (Beer,

(1992), no qual plantas podem ser avaliadas com apenas quatro semanas, após a inoculação.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo discutir sobre os vários métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* utilizados para a seleção de plantas visando à resistência ao mal-do-Panamá.

Métodos de inoculação e testes de patogenicidade de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* em bananeiras.

Brandes, citado por Rishbeth (1955), estabeleceu que *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) era o agente causal do mal-do-Panamá. Sendo o primeiro a conseguir mostrar os sintomas típicos dessa enfermidade, utilizando tubos de cimento com, aproximadamente, 1m de diâmetro e 1,20m de profundidade, enterrados no solo, de modo que apenas 15 cm ficassem na superfície do solo. Os tubos receberam uma mistura de argila com areia lavada, ambas, previamente esterilizadas. Em seguida, esse substrato foi inoculado com uma cultura do patógeno, recebendo posteriormente rizomas sadios de bananeiras em seu interior. Oito meses após a inoculação, os sintomas foram refletidos nas plantas.

Rishbeth (1955), cita que embora os primeiros testes de patogenicidade, desenvolvidos por Brandes, tenham refletido os sintomas ocasionados pelo patógeno. Estes foram considerados trabalhosos, quando se tinham muitas plantas ou muitos isolados do patógeno para serem testados.

De acordo com o autor, nos testes de patogenicidade realizados em vasos, mediante o uso de mudas de pequeno tamanho, foi possível verificar que a infecção do rizoma assemelhava-se aquele dos primeiros estágios da doença no campo. Onde os isolados patogênicos do fungo causaram em média 8,1 infecções/rizoma.

Porém, este mesmo autor, menciona que o processo de infecção ainda está relacionado com o tipo de substrato usado para testes de patogenicidade em vasos, visto que a flutuação da umidade influencia no processo da doença, da mesma forma que danos por plasmólise podem reduzir a resistência à infecção.

Em 1931, Cheesman, citado por Vakili (1965), já havia relatado sobre uma prática de seleção de plantas que foi usada nos programas de fitomelhoramento. Esta prática consistia em se fazer aclimatar e crescer plântulas em vasos, antes do transplante para o viveiro e, mais tarde, essas mudas eram transplantadas para uma área onde a cultivar "Gross Michel" havia sido eliminada pelo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Porém, segundo Vakili (1965), esse método era moroso e apresentava a desvantagem de permitir escapes, que poderiam ser usados como materiais para o melhoramento genético.

Em 1984, Sun e Su, mergulharam plântulas originadas de cultura de meristema numa suspensão de inóculo (3×10^4 conídios/ml) antes do replantio, sugerindo ser um método para identificação de resistência à murcha. Os autores supunham que os resultados do teste de patogenicidade, apresentados depois de um mês, fossem iguais aqueles de plantas de bananeiras já desenvolvidas. Porém, os resultados mostraram ser essa uma forma muito severa de inoculação, pois quebrava a resistência dos clones de Lady Finger e Cavendish, não permitindo correlacionar a expressão da murcha sob condições de campo.

Hwang (1985), citado por Hwang (1991), desenvolveu uma técnica de seleção em casa de vegetação que parecia ser o procedimento mais seguro de inoculação. Onde plantas para testes eram plantadas em solo contendo 600 ufc/g de solo, sendo examinados os sintomas da doença, dois meses após a inoculação. Por essa técnica, foram testadas cerca de 20.000 plantas, das quais sete foram resistentes ao mal-do-Panamá.

De acordo com (Wardlaw e Smith, 1931; Rishbeth, 1955; Wardlaw, 1972), o desenvolvimento da doença é afetado pela composição orgânica e pelo pH do solo, que interfere na população de microrganismos da rizosfera, assim como na absorção de nutrientes pela planta. E, que solos ácidos e arenosos favorecem uma severa e rápida disseminação da doença

Chuang (1986), também observou que solos constituídos de 50% de areia, 19% de silte, 31% de argila, 3,2% de M. O e pH 5,1, também permitem a proliferação do patógeno.

Zambolim e Ventura (1992), afirmam que plantas com desequilíbrios nutricionais são mais susceptíveis aos patógenos do que aquelas com nutrição equilibrada. No caso do mal-do-Panamá, níveis baixos de P, K, Ca, Zn, Mg e níveis altos de N e Mn, bem como pH inferior a 6,0, são características químicas do solo, favoráveis à infecção da doença.

Com relação às injúrias, Sequeira et al. (1958) e Wardlaw (1972) afirmam que ferimentos vasculares promovem a infecção e que ferimentos superficiais e outros ferimentos que não atingem o tecido vascular não permitiram a entrada do patógeno. Pois, uma camada de parênquima cortical de apenas duas a três células de espessura, segundo os mesmos autores, parece prevenir completamente a planta contra a infecção.

Segundo Wardlaw (1972), a poda efetuada na base das raízes junto com as injúrias causadas por insetos no rizoma são as maiores "portas de entrada" para o patógeno. Assim como, a presença do nematóide *Radopholus similis* encurta o período de tempo para a infecção e o aparecimento dos sintomas da murcha de *Fusarium*.

Ainda de acordo com Wardlaw (1972), existe uma correlação direta entre a quantidade de inóculo nas proximidades do sistema radicular com a quantidade de infecção e o tempo de aparecimento dos sintomas. Quanto mais bem distribuído o fungo estiver no solo, maior a infecção.

De suas observações, Sequeira et al. (1958), chegaram às seguintes conclusões, de importância para os trabalhos de patogenicidade do agente causal do mal-do-Panamá.

1. A tendência corrente de descuidar-se das raízes primárias como importante "porta de entrada", precisa ser reexaminada, quando elas são injuriadas;
2. O papel da injúria na infecção por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* precisa ser considerado em todas as investigações futuras, não apenas como uma condição de penetração, mas também como uma fonte de influência no estímulo da germinação de esporos, bem como do aumento da probabilidade de sucesso na penetração;
3. É imperativo avaliar a importância das injúrias na penetração de raízes laterais pelo patógeno, e também determinar a aplicabilidade das observações desse tipo de trabalho em bananeiras, cultivadas em diferentes circunstâncias e, principalmente, sob condições de solo.

Dos experimentos de inoculação desenvolvidos por Rodrigues (1994), foi desenvolvida uma metodologia que possibilita diferenciar cultivares de bananeiras resistentes de susceptíveis, após quatro semanas da inoculação. O método consistiu de inoculações em plantas enraizadas sem aclimação, aclimatadas por um mês, e plantas aclimatadas por três meses. Foram utilizados dois inóculos do patógeno. A inoculação foi feita por imersão de raízes, por 20 segundos, em suspensão de inóculo, com 10^6 conídios/mL, e por deposição de 30 g de mistura de arroz/areia, com $4,5 \times 10^5$ ufc, em vasos antes do plantio. Permitindo com isto, determinar os graus de resistência ao mal-do-Panamá entre as plantas avaliadas.

Dias (2000), objetivando verificar a variabilidade patogênica entre diferentes isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC), realizou um experimento em telado, onde três cultivares de bananeiras diferenciadoras de raças de FOC, originadas de cultura de tecidos, foram inoculadas após ferimento na base do rizoma, próximo à inserção das raízes. Foram feitas duas inoculações, uma vertendo-se 100 mL de uma suspensão de $3,5 \times 10^5$ esporos/mL, no solo, em sacos plásticos, ao redor de plantas com 07 meses de idade e outra com 40 mL de uma suspensão de 1×10^6 esporos/mL ao redor de plantas com 08 meses de idade. Após duas semanas da última inoculação, a autora verificou que o método havia permitido realizarem-se avaliações tanto de sintomas externos quanto

internos, não observando-se entre os isolados em estudo, maior variabilidade patogênica entre eles, identificando-se desta forma, apenas uma raça do patógeno.

Considerações Finais

Com base no exposto, verifica-se que a utilização de mudas propagadas por cultura de tecidos e avaliadas em casa-de-vegetação, está se tornando uma alternativa viável, facilitando e reduzindo o tempo de avaliação de plantas com sintomas do mal-do-Panamá em relação às plantas avaliadas em nível de campo. Assim como, proporciona a produção e a seleção de plantas sadias, a serem utilizadas em bananeis novos a serem implantados.

Referências Bibliográficas

- DIAS, J. do S. A. Caracterização de isolados de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* com relação à compatibilidade vegetativa e à patogenicidade. Lavras: UFLA, 2000. 85 p. : il. (Dissertação de Mestrado).
- HWANG, S. C. Somaclonal resistance in cavendish banana to *Fusarium* Wilt. In: VALMAYOR, R.V. **Banana Diseases in Asia and the Pacific**. S.I. INIBAP, 1991. P. 124-134.
- RISHBETH, J. *Fusarium* wilt of bananas in Jamaica. I some observation on the epidemiology of the disease. **Annals of Botany**, 19-(75): 293-340, 1955.
- RISHBETH, J. Factors affecting the incidence of banana wilt. **Exp. Agr.**, 25: 111-13, 1960.
- RODRIGUES, E.J.R. Micropropagação da bananeira e avaliação de métodos de inoculação de *Fusarium oxysporum* schlecht. f. sp. *cubense* (E.F. Smith) snyd & Hans. Viçosa, MG, UFV, 1994. 54p. (Tese M.S.).
- SEQUEIRA, L.; STEEVES, T. A.; STEEVES, M. W.; RIEDHART, J. H. Role of root injury in Panama Disease infection. **Nature**, 182 (4631): 309-11, 1958.
- SUN, E. J. & SU, H.J. Rapid method for determining differential pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* using banana plantlets. **Tropical Agriculture**, 61(1): 7-8, 1984.

VAKILI, N. G. *Fusarium* wilt resistance in seedling and mature plants of *Musa* species. **Phytopathology**, 55(2): 135-40, 1965.

WARDLAW, C. W. & SMITH, E. F. *Fusarium cubense* on examination. **Tropical Agriculture**, 8 (3): 54-60, 1931.

WARDLAW, C. W. Panama disease. In: WARDLAW, C. W. **Banana disease including plantains and abaca**. 2.ed. Londres: Logman, 1972. Cap. 7-8, p. 188-276.

ZAMBOLIM, L. & VENTURA, J. A. **Curso de Agricultura Tropical**. Brasília, ABEAS, 1992. 45p. (ABEAS - Curso de Agricultura Tropical).